

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018719

International filing date: 15 December 2004 (15.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-425691
Filing date: 22 December 2003 (22.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 2 月 2 2 日

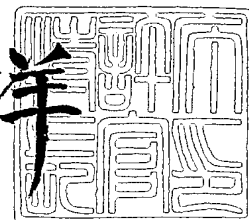
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 4 2 5 6 9 1
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 2 5 6 9 1]

出 願 人
Applicant(s): 中 村 敏 一

2 0 0 5 年 1 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 N13J1283
【提出日】 平成15年12月22日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
A61K 38/00
C12P 21/02
C07K 14/475

【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町 1 番地の 4
【氏名】 中村 敏一

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6 - 2 5 - 2 - 2 - 2 0 4 号
【氏名】 松本 邦夫

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 5 - 1 8 - 2 7 Tメゾンロベリア 2 0
2 号
【氏名】 福田 一弘

【特許出願人】
【識別番号】 591115073
【氏名又は名称】 中村 敏一

【代理人】
【識別番号】 100077012
【弁理士】
【氏名又は名称】 岩谷 龍

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-418790
【出願日】 平成15年12月16日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 066372
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0204590

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の全部または少なくとも一ヶ所において糖鎖が欠損していることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。

【請求項 2】

請求項 1 記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、肝細胞増殖因子の少なくとも 1 ヲ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異が導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。

【請求項 3】

肝細胞増殖因子のアミノ酸配列に対して、次の a) から d) に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする請求項 2 記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；
a) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する A s n - X - S e r または A s n - X - T h r (X は P r o 以外のアミノ酸を示す。) で示される N-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列の A s n が他のアミノ酸残基に置換されている；

b) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する A s n - X - S e r または A s n - X - T h r (X は P r o 以外のアミノ酸を示す。) で示される N-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、一つのコンセンサス配列の S e r または T h r、あるいは 2 以上のコンセンサス配列の S e r または / および T h r が他のアミノ酸残基に置換されている；

c) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する A s n - X - S e r または A s n - X - T h r (X は P r o 以外のアミノ酸を示す。) で示される N-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列の X が P r o に置換されている；または

d) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する少なくとも一つの O-結合型糖鎖付加を受ける S e r または / および T h r が他のアミノ酸残基に置換されている。

【請求項 4】

肝細胞増殖因子がヒト肝細胞増殖因子であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。

【請求項 5】

肝細胞増殖因子がネコまたはイヌ肝細胞増殖因子であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。

【請求項 6】

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をもとに改変される請求項 1 から 4 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、配列番号 1 中のアミノ酸に対して、次の a) から e) に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 第 2 9 4 位または / および第 2 9 6 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または / および第 2 9 5 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 2 9 4 位に糖鎖が付加されていない；

b) 第 4 0 2 位または / および第 4 0 4 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または / および第 4 0 3 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 4 0 2 位に糖鎖が付加されていない；

c) 第 4 7 6 位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第 4 7 6 位に糖鎖が付加されていない；

d) 第 5 6 6 位または / および第 5 6 8 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または / および第 5 6 7 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 5 6 6 位に糖鎖が付加されていない；または

e) 第 6 5 3 位または / および第 6 5 5 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または / および第 6 5 4 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 6 5 3 位に糖鎖が付加されていない。

【請求項 7】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をもとに改変される請求項 1 から 4 のいずれかに記載の肝細胞増殖因子であって、配列番号 2 中のアミノ酸に対して、次の a) から e) に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 第 289 位または／および第 291 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または／および第 290 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 289 位に糖鎖が付加されていない；

b) 第 397 位または／および第 399 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または／および第 398 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 397 位に糖鎖が付加されていない；

c) 第 471 位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第 471 位に糖鎖が付加されていない；

d) 第 561 位または／および第 563 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または／および第 562 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 561 位に糖鎖が付加されていない；または

e) 第 648 位または／および第 650 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または／および第 649 位のアミノ酸が P r o に置換されていることによって第 648 位に糖鎖が付加されていない。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子をコードする塩基配列からなる DNA。

【請求項 9】

請求項 8 記載の DNA を組み込んだベクター。

【請求項 10】

請求項 9 記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を産生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 11】

細胞が真核細胞である請求項 10 記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 12】

真核細胞が酵母または昆虫細胞である請求項 11 記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 13】

請求項 9 記載のベクターを昆虫個体に導入し、昆虫個体中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を産生せしめ、該昆虫個体から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 14】

糖鎖を有する肝細胞増殖因子を酵素で処理することによって糖鎖を全部または部分的に除去し、該酵素反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 15】

糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列を含む DNA を組み込んだベクターまたは請求項 9 記載のベクターからなる遺伝子を糖鎖付加能のない細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を産生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 16】

糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列または請求項 8 記載の塩基配列から

なる遺伝子を鋳型として無細胞蛋白質合成システムによって糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を合成し、該合成反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を有効成分とする医薬製剤。

【請求項 1 8】

請求項 8 記載の DNA を含む遺伝子治療薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】糖鎖欠損型肝細胞増殖因子

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、糖鎖欠損型肝細胞増殖因子に関する。より詳細には、肝細胞増殖因子の糖鎖を欠損させることによって改変した肝細胞増殖因子に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

肝細胞増殖因子（以下、HGFともいう。）は肝実質細胞の増殖活性を有する蛋白質であり、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されており、その名称はHGF以外にSF（scatter factor）、TCF（Tumor cytotoxic factor）などが使用されている。本発明では、これらの公知の肝実質細胞増殖活性を有する蛋白質をHGFと総称する。HGFは肝実質細胞の増殖以外にも細胞遊走促進、形態形成促進、血管新生作用、神経保護作用、抗アポトーシス作用など様々な薬理作用を示す生理活性ペプチドであることが知られている（非特許文献1参照。）。HGFはその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤などとしての開発が期待されている（例えば特許文献1～14参照。）。

【0 0 0 3】

HGFは、肝臓、脳、肺臓、骨髄、ひ臓、胎盤、腎臓などの臓器あるいは血小板や白血球などの血液細胞などから分泌されるが、生体内には極微量にしか存在しないため、HGF蛋白質を医薬製剤として用いるためには、遺伝子工学的手法により細胞を用いて大量に生産する必要がある。従来、HGFはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの動物細胞を用いて生産できることが知られている（特許文献15、16参照。）。

しかし、一般にCHO細胞などの動物細胞を用いて蛋白質を生産する方法はコストが高く、引いては薬価の上昇につながることを考えられる。

【0 0 0 4】

安価に蛋白質を組換え生産する方法としては、大腸菌などの原核生物に目的遺伝子を導入して発現させる方法が知られている（非特許文献2参照。）。しかし、大腸菌などの原核生物で生産した組換え蛋白質には糖鎖が付加されないという問題がある。これは、大腸菌などの原核生物には糖鎖生合成の場である小胞体およびゴルジ体が存在しないからである。

【0 0 0 5】

動物細胞内での蛋白質への糖鎖付加および糖鎖の修飾は、DNAあるいは蛋白質の生合成の場合とは異なり、鋳型によらない翻訳後修飾（post-translational modification）である。この翻訳後修飾は小胞体およびゴルジ体と呼ばれる細胞内小器官に局在する数多くの糖鎖生合成関連酵素が介在する複雑な機構を通して行われる。すなわち、特定の単糖と、その結合様式に特異的な酵素（糖加水分解酵素および糖転移酵素）の連携による複雑な生合成経路に従って、単糖が順次切り取られたり付加されたりしながら、所定の糖鎖構造が得られるように糖鎖が伸長されていく（非特許文献3参照。）。このようにして蛋白質に付加される糖鎖は高等生物の生命現象全般に深く関わっていることが知られている（非特許文献4、5参照。）。

【0 0 0 6】

ヒト体内の蛋白質の半数以上は糖鎖が付加された糖蛋白質として存在することが知られている（非特許文献6参照。）。

本来糖鎖の付加された形で存在し、活性を有する糖蛋白質を糖鎖のない状態にすると、活性を失うことが懸念される。例えば、赤血球造血ホルモンとして知られるエリスロポチ

ンでは糖鎖を除去すると薬効を失ってしまうことが知られている（非特許文献 7 参照。）。

【0 0 0 7】

蛋白質を安価に生産できる宿主で糖鎖付加の能力を有する細胞としては酵母が知られている（非特許文献 8 ～ 1 0 参照。）。酵母は真核生物であり、小胞体およびゴルジ体を有しているため、糖鎖生合成機構が備わっている。しかし、酵母の糖鎖生合成機構は動物細胞とは大きく異なっているため、糖鎖付加部位を有する蛋白質を酵母で生産すると、酵母型の糖鎖が付加されることになる。酵母の糖鎖構造はヒトその他の哺乳動物の糖鎖構造とは大きく異なっていることが知られている（非特許文献 1 1 参照。）。

このため、このような組換え蛋白質はヒトその他の哺乳動物に対して抗原性を示すのでヒトおよび動物の医薬品として用いることはできない。

【0 0 0 8】

また、昆虫細胞も糖鎖付加能を有する宿主であって、比較的安価に蛋白質を生産することができるが、昆虫細胞の糖鎖構造もヒト型の糖鎖構造とは異なることが知られている（非特許文献 1 2 参照。）。

従って、昆虫細胞もヒトその他の哺乳動物に対して抗原性を示す可能性がある。

【0 0 0 9】

そこで、酵母や昆虫細胞などを用いて生産した蛋白質から糖鎖を除去するか、もしくは蛋白質分子中の糖鎖付加部位に変異が導入されるようにした遺伝子を酵母や昆虫細胞などに導入することで、糖鎖付加のない蛋白質をつくることが考えられる。しかし、上述のように、本来糖鎖の付加された形で存在する蛋白質を糖鎖のない状態にすると、活性を失うことが懸念される。

【0 0 1 0】

H G F は 5 本の糖鎖が付加されている（非特許文献 1 3、1 4 参照。）。H G F の糖鎖を除去した場合の活性への影響については、N-結合型糖鎖付加の阻害剤であるツニカマイシンを H G F 産生細胞に添加して培養した場合、産生される H G F が細胞遊走活性を保持しているとの報告がある（論文中では H G F は S F と表されている）（非特許文献 1 5 参照。）。

しかし、この論文では、ツニカマイシン存在下で産生された H G F の糖鎖がどの程度欠損しているかについての解析がなされておらず、十分な知見を与えるものではない。

また、同論文において、H G F を N-グリカナーゼや O-グリカナーゼで処理しても、H G F が細胞遊走活性を保持しているとの記載があるが、同論文中では N-グリカナーゼ処理した H G F や O-グリカナーゼ処理した H G F が、糖鎖を認識する C o n A カラムに吸着されていることを示している。N-グリカナーゼ処理した H G F や O-グリカナーゼ処理した H G F が C o n A カラムに吸着されることは、糖鎖の除去が十分になされていないことを意味する。したがって、N-グリカナーゼ処理した H G F や O-グリカナーゼ処理した H G F が細胞遊走活性を保持しているとの記載は、糖鎖を欠損した H G F が細胞遊走活性を保持していると結論づけるものではない。

【0 0 1 1】

さらに、H G F は細胞遊走活性に加えて細胞増殖、形態形成促進、血管新生作用、抗細胞死活性、神経保護作用など多岐にわたる活性を有している（非特許文献 1 6 参照。）。

糖鎖を欠損した H G F が細胞遊走活性を有していても、他の機能も有しているとは言い難い。例えば、H G F のトランケート型バリエーションである N K 2 は、細胞遊走活性を有するが、細胞増殖活性は有していない（非特許文献 1 7 参照。）。

このように、H G F の糖鎖が欠損した場合に、H G F が多彩な機能を保持しているかどうかは全く不明であった。H G F は多彩な活性を有することから、生体修復因子と考えられており、H G F の糖鎖を欠損させても、H G F の高度な機能に影響がないとは考えられなかった。

【特許文献 1】特開平 4 - 1 8 0 2 8 号公報

【特許文献 2】特開平 4 - 4 9 2 4 6 号公報

- 【特許文献3】欧州特許出願公開第492614号明細書
【特許文献4】特開平6-25010号公報
【特許文献5】国際公開第93/8821号パンフレット
【特許文献6】特開平6-172207号公報
【特許文献7】特開平7-89869号公報
【特許文献8】特開平6-40934号公報
【特許文献9】国際公開第94/2165号パンフレット
【特許文献10】特開平6-40935号公報
【特許文献11】特開平6-56692号公報
【特許文献12】特開平7-41429号公報
【特許文献13】国際公開第93/3061号パンフレット
【特許文献14】特開平5-213721号公報
【特許文献15】特開平11-4696号公報
【特許文献16】特開平10-191991号公報
【非特許文献1】マツモト・ケー (Matsumoto, K.) ら、キドニー・インターナショナル (Kidney International)、2001年、第59巻、p. 2023-2038
【非特許文献2】スワーツ・ジェイ・アール (Swarts, J. R.)、カレント・オピニオン・イン・バイオテクノロジー (Current opinion in biotechnology)、2001年、第12巻、p. 195-201
【非特許文献3】コーンフェルド・アール (Kornfeld, R.) 他1名、アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (Annual review of biochemistry)、1985年、第54巻、p. 631-664
【非特許文献4】コバタ・エー (Kobata, A.)、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European journal of biochemistry)、1992年、第209巻、p. 483-501
【非特許文献5】バーキ・エー (Varki, A.)、グリコバイオロジー (Glycobiology)、1993年、第3巻、p. 97-130
【非特許文献6】グーチャー・シー・エフ (Goochee, C. F.) ら、バイオテクノロジー (Biotechnology)、1991年、第9巻、p. 1347-1355
【非特許文献7】タケウチ・エム (Takeuchi, M.) 他1名、グリコバイオロジー (Glycobiology)、1991年、第1巻、p. 337-346
【非特許文献8】ウイスマン・エー (Wiseman A.)、エンデボーア (Endeavour)、1996年、第20巻、p. 130-132
【非特許文献9】ラッセル・シー (Russell, C.) ら、オーストラリアン・ジャーナル・オブ・バイオテクノロジー (Australian journal of biotechnology)、1991年、第5巻、p. 48-55
【非特許文献10】ブックホルツ・アール・ジー (Buckholz, R. G.) 他1名、バイオテクノロジー (Biotechnology)、1991年、第9巻、p. 1067-1072
【非特許文献11】ゲミル・ティー・アール (Gemmill, T. R.) 他1名、バイオケミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et biophysica acta)、1999年、第1426巻、p. 227-237
【非特許文献12】アルトマン・エフ (Altmann, F.) ら、グリココンジュゲイト・ジャーナル (Glycoconjugate journal)、1999年、第16巻、p. 109-123
【非特許文献13】ハラ・エイチ (Hara, H.) ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of biochemistry)、1993年、第114巻、p. 76-82

【非特許文献14】シミズ・エヌ (Shimizu, N.) ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and biophysical research communications)、1992年、第189巻、p. 1329-1335

【非特許文献15】ホフマン・アール (Hofmann, R.) ら、バイオケミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et biophysica acta)、1992年、第1120巻、p. 343-350

【非特許文献16】マツモト・ケー (Matsumoto, K.) 他1名、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and biophysical research communications)、1997年、第239巻、p. 639-644

【非特許文献17】ハートマン・ジー (Hartmann, G.) ら、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、1992年、第239巻89巻、p. 11574-11578

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、HGFの糖鎖を欠損させた糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を提供し、またその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは上記課題を解決すべくHGFの糖鎖機能に関する研究を鋭意重ねた結果、HGFの糖鎖を除去してもHGFの機能が保持されることを見出した。HGFのような高度な機能を有する蛋白質が、糖鎖を除去しても機能を保持していることは全く予想外のことであった。それどころか、糖鎖欠損型HGFは糖鎖を有するHGFに比べて血中安定性が向上しており、このような事実は全く驚くべき発見であった。以上の発見に基づき、本発明者らはさらに研究をすすめる本発明の完成に至った。

すなわち、本発明は、

(1) 肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の全部または少なくとも一ヶ所において糖鎖が欠損していることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(2) 上記(1)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、肝細胞増殖因子の少なくとも1ヶ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異が導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(3) 肝細胞増殖因子の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子のアミノ酸配列に対して、次のa)からd)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする上記(2)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-SerまたはAsn-X-Thr (XはPro以外のアミノ酸を示す。) で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のAsnが他のアミノ酸残基に置換されている；

b) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-SerまたはAsn-X-Thr (XはPro以外のアミノ酸を示す。) で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、一つのコンセンサス配列のSerまたはThr、あるいは2以上のコンセンサス配列のSerまたは／およびThrが他のアミノ酸残基に置換されている；

c) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-SerまたはAsn-X-Thr (XはPro以外のアミノ酸を示す。) で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のXがProに置換されている；ま

たは

d) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する少なくとも一つのO-結合型糖鎖付加を受けるSerまたは/およびThrが他のアミノ酸残基に置換されている、

(4) 肝細胞増殖因子がヒト肝細胞増殖因子であることを特徴とする上記(1)から(3)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(5) 肝細胞増殖因子がネコまたはイヌ肝細胞増殖因子であることを特徴とする上記(1)から(3)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(6) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をもとに改変される上記(1)から(4)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、配列番号1中のアミノ酸に対して、次のa)からe)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 第294位または/および第296位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第295位のアミノ酸がProに置換されていることによって第294位に糖鎖が付加されていない；

b) 第402位または/および第404位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第403位のアミノ酸がProに置換されていることによって第402位に糖鎖が付加されていない；

c) 第476位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第476位に糖鎖が付加されていない；

d) 第566位または/および第568位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第567位のアミノ酸がProに置換されていることによって第566位に糖鎖が付加されていない；または

e) 第653位または/および第655位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第654位のアミノ酸がProに置換されていることによって第653位に糖鎖が付加されていない、および

(7) 配列番号2に記載のアミノ酸配列をもとに改変される上記(1)から(4)のいずれかに記載の肝細胞増殖因子であって、配列番号2中のアミノ酸に対して、次のa)からe)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 第289位または/および第291位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第290位のアミノ酸がProに置換されていることによって第289位に糖鎖が付加されていない；

b) 第397位または/および第399位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第398位のアミノ酸がProに置換されていることによって第397位に糖鎖が付加されていない；

c) 第471位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第471位に糖鎖が付加されていない；

d) 第561位または/および第563位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第562位のアミノ酸がProに置換されていることによって第561位に糖鎖が付加されていない；または

e) 第648位または/および第650位のアミノ酸が他のアミノ酸に、または/および第649位のアミノ酸がProに置換されていることによって第648位に糖鎖が付加されていない、

に関する。

【0014】

また、本発明は、

(8) 上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子をコードする塩基配列からなるDNA、

(9) 上記(8)記載のDNAを組み込んだベクター、

(10) 上記(9)記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは

は該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を産生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(11) 細胞が真核細胞である上記(10)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(12) 真核細胞が酵母または昆虫細胞である上記(11)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(13) 上記(9)記載のベクターを昆虫個体に導入し、昆虫個体中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を産生せしめ、該昆虫個体から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(14) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子を酵素で処理することによって糖鎖を全部または部分的に除去し、該酵素反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(15) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列を含むDNAを組み込んだベクターまたは上記(9)記載のベクターからなる遺伝子を糖鎖付加能のない細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を産生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(16) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列または上記(8)記載の塩基配列からなる遺伝子を鋳型として無細胞蛋白質合成システムによって糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を合成し、該合成反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、

(17) 上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を有効成分とする医薬製剤、および

(18) 上記(8)記載のDNAを含む遺伝子治療薬、に関する。

【発明の効果】

【0015】

本発明の糖鎖欠損型HGFは、細胞増殖活性、細胞遊走活性、形態形成活性などにおいて糖鎖を有するHGFと同等の活性を有し、温度安定性も同等であるので、糖鎖を有するHGFの代替品となり得る。従って、本発明の糖鎖欠損型HGFを有効成分とする医薬製剤は、糖鎖を有するHGFと同様の用途、すなわち、哺乳動物(例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、モルモットなど)に対し、肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤などとして用いることができる。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFをコードするDNAを含む医薬は、上記疾患の遺伝子治療薬として用いることができる。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFは糖鎖を有するHGFよりも血中安定性が向上しているので、HGFの投与量を低減することができ、副作用の防止が図れる。

本発明の糖鎖欠損型HGFは、酵母や昆虫細胞での生産が可能であるため、安価に糖鎖欠損型HGFを生産することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係わる糖鎖欠損型HGFは、糖鎖を有する哺乳動物、例えばヒト、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、モル

モットなどのHGFの糖鎖付加部位の全部または少なくとも1ヶ所の糖鎖が欠損するように、構造が改変されたHGFをいう。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFには、公知のHGFに糖鎖が付加されないように変異が導入されたアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有する蛋白質も含まれる。さらに、本発明の糖鎖欠損型HGFには、公知のHGFに糖鎖が付加されないように変異が導入されたアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有する蛋白質、好ましくは80%以上の相同性を有する蛋白質、より好ましくは90%以上の相同性を有する蛋白質、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する蛋白質であって、かつHGF活性を有する蛋白質も含まれる。

なお、アミノ酸配列について、「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入」とは、部位特異的突然変異誘発法などの周知の技術的方法により、または天然に生じる程度为数が、欠失、置換、付加または挿入などされていることを意味する。

また、上記アミノ酸配列について「相同」とは、蛋白質の一次構造を比較し、配列間において各々の配列を構成するアミノ酸残基の一致の程度の意味である。

本発明の糖鎖欠損型HGFは、HGFの糖鎖付加部位の少なくとも一ヶ所において糖鎖が付加されないように変異を導入したHGF遺伝子を組み込んだベクターを細胞に導入して得られる。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFは、糖鎖を有するHGFの塩基配列を含むベクターを糖鎖付加能のない細胞に導入して得ることもできる。

【0017】

HGFの糖鎖付加部位の少なくとも一ヶ所において糖鎖が付加されないようにHGF遺伝子に変異を導入する方法としては、欠損させたい糖鎖の付加部位のアミノ酸配列に対応する塩基配列に変異を導入するのがよい。蛋白質に糖鎖が付加する場合、糖鎖にはN結合型糖鎖とO-結合型糖鎖があるので、それぞれについて次のような変異を導入する。

N-結合型糖鎖にはコンセンサス配列〔Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr (Xはプロリン以外のアミノ酸を示す。)〕が知られている。コンセンサス配列が存在するときにはAsnに糖鎖が結合する(Kobata, A., Eur. J. Biochem., 1992年、第209巻、p. 483-501)。このため、コンセンサス配列中のAsnを他のアミノ酸(例えば、Glnなど)に変換するか、あるいは、SerまたはThrを他のアミノ酸(例えば、Gly、Alaなど)に変換するように塩基配列に変異を導入することで、該当部位のN-結合型糖鎖を欠損させることができる。この場合、変換に用いるアミノ酸は、上記コンセンサス配列の前後のアミノ酸配列と新たなコンセンサス配列を形成しないアミノ酸を適宜選択するのが好ましい。また、コンセンサス配列中のXの部位にプロリンが導入されるように塩基配列に変異を導入してもよい。

O-結合型糖鎖にはコンセンサス配列は存在しないが、O-結合型糖鎖では、SerかThrの水酸基に糖鎖が付加するので、O-結合型糖鎖付加を受ける部位のSerまたはThrを他のアミノ酸(例えば、Glyなど)に変換するように塩基配列に変異を導入することで該当部位の糖鎖を欠損させることができる。この場合、変換に用いるアミノ酸は、該アミノ酸の前後のアミノ酸配列と上記コンセンサス配列を形成しないアミノ酸を適宜選択するのが好ましい。

【0018】

HGFにおける糖鎖付加部位は、例えばヒトHGFにおいては、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の第294位のAsn(N-結合型糖鎖)、第402位のAsn(N-結合型糖鎖)、第476のThr(O-結合型糖鎖)、第566位のAsn(N-結合型糖鎖)、第653位のAsn(N-結合型糖鎖)である。また、配列表の配列番号2で示される5アミノ酸欠失型ヒトHGFにおける糖鎖付加部位は、第289位のAsn(N-結合型糖鎖)、第397位のAsn(N-結合型糖鎖)、第471のThr(O-結合型糖鎖)、第561位のAsn(N-結合型糖鎖)、第648位のAsn(N-結合型糖鎖)である。

また、上記ヒト HGF の上記コンセンサス配列は、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の第 294 位から第 296 位、第 402 位から第 404 位、第 566 位から第 568 位、および第 653 位から第 655 位に存在する。5 アミノ酸欠失型ヒト HGF では、コンセンサス配列は、配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の第 289 位から第 291 位、第 397 位から第 399 位、第 561 位から第 563 位、および第 648 位から第 650 位に存在する。

【0019】

HGF の塩基配列に変異を導入する方法としては、変異を導入したい部分に対応する変異プライマーを合成し、クンケル法などの既知の技術を用いて行うことができる。また、市販の変異導入キットなどを用いるとより簡便に変異を導入することができる。

こうして得られた糖鎖欠損型 HGF のアミノ酸配列をコードする DNA あるいは糖鎖を有する HGF のアミノ酸配列をコードする DNA を含有するプラスミドやファージなどの組換えベクターから、制限酵素によって該 DNA を切り出し、糖鎖欠損型 HGF の発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素と DNA リガーゼを用いて再結合して組換え発現ベクターを作製することが出来る。より詳しくは、転写の下流方向に順番に、必要により (1) プロモーター、(2) リボソーム結合部位、(3) 開始コドン、(4) 本発明の糖鎖欠損型 HGF をコードする塩基配列を含む DNA、(5) 終止コドン、(6) ターミネーターを含むように組換え発現ベクターが構築される。

上記 DNA には、上記糖鎖付加部位に変異が導入された糖鎖欠損型 HGF をコードする塩基配列からなる DNA だけでなく、(a) 前記糖鎖欠損型 HGF をコードする塩基配列の塩基の 1 もしくは数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつ HGF 活性を有する蛋白質をコードする DNA、(b) 前記糖鎖欠損型 HGF をコードする塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ HGF 活性を有する蛋白質をコードする塩基配列からなる DNA、または (c) 前記糖鎖欠損型 HGF をコードする塩基配列を有する DNA と少なくとも 60% 以上の相同性を有し、かつ HGF 活性を有する蛋白質をコードする塩基配列からなる DNA も包含するものである。

上記塩基配列について、「1 もしくは数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入」というときは、部位特異的突然変異誘発法などの周知の技術的方法により、または天然に生じる程度の数の塩基が、欠失、置換、付加または挿入などされていることを意味する。

ストリジェントな条件下でハイブリダイズ可能な DNA とは、上記 DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られる DNA を意味する。

ストリジェントな条件とは、例えば、塩濃度、0.1~2 倍程度の濃度の SSC 溶液 (1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムよりなる。)、温度約 65℃ 程度でのハイブリダイズ条件をいう。

相同性を有する DNA とは、ハイストリジェントな条件において、少なくとも約 60% 以上の相同性を有する DNA、好ましくは約 80% 以上の相同性を有する DNA、より好ましくは、約 90% 以上の相同性を有する DNA、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する DNA をいう。なお、ハイストリジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19~40 mM 程度、好ましくは約 19~20 mM 程度で、温度が約 50~70℃ 程度、好ましくは約 60~65℃ 程度の条件をいう。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65℃ 程度の場合が最も好ましい条件である。

【0020】

本発明で用いることが出来るベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合は pBR322、pUC18、pUC19 (東洋紡績) などのプラスミドを、枯草菌を宿主とする場合は pUB110 (シグマ社) などのプラスミドを、酵母を宿主とする場合は pYES2 (Invitrogen)、pRB15 (ATCC37062) などのプラスミドを用いることができる。動物細胞用の発現ベクターとしては、pCAGGS および pCXN2 (N

iwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene, 1991年, 第108巻, p. 193-200、特開平03-168087)、pcDL-SR α (Takebe, Y. et al., Mol. Cell. Biol., 1988年、第8巻、p. 466-472)などが挙げられる。その他、バクテリオファージ λ gt10、 λ gt11 (ストラタジーン社)、ウイルスSV40 (BRL社)、BPV (ATCC VR-703)、レトロウイルスの遺伝子由来のベクターなどが列挙できるが、宿主内で複製・増幅可能なベクターであれば特に限定はない。

【0021】

プロモーターおよびターミネーターに関しても、糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定はない。プロモーターの例としては、宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが挙げられ、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、ラウス肉腫ウイルス (ウイルスRSV)、MP SV、ポリオマーウイルス、鶏頭ウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス (SMV)、B型肝炎ウイルス、シミアンウイルス40 (SV40)、ワクシニアウイルスなどのウイルスゲノムから得られるプロモーター、メロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。また、高等哺乳動物宿主を用いる際には、好ましくは、ベクターにエンハンサーを導入する。エンハンサーを導入することにより転写が増大する。エンハンサーとしては、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーター／エンハンサー、ポリオマーエンハンサー、アデノウイルスのエンハンサーなどが挙げられる。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、trpターミネーター、lppターミネーターなどを、宿主が枯草菌の場合、amyFターミネーターなどを、宿主が酵母の場合、CYC1ターミネーターなどを、宿主が動物細胞の場合、SV40ターミネーター、HSV1TKターミネーターなどを例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適宜組み合わせて用いるのがよい。

【0022】

このようにして構築された糖鎖欠損型HGF発現ベクターは、コンピテント細胞法 (J. Mol. Biol., 1970年、第53巻、p. 154)、プロトプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978年、第75巻、p. 1929)、リン酸カルシウム法 (Science, 1983年、第221巻、p. 551)、DEAEデキストラン法 (Science, 1982年、第215巻、p. 166)、電気パルス法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984年、第81巻、p. 7161)、インビトロパッケージング法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975年、第72巻、p. 581)、ウイルスベクター法 (Cell, 1984年、第37巻、p. 1053)、またはマイクロインジェクション法 (Exp. Cell. Res., 1984年、第153巻、p. 347) などによって宿主に導入され、形質転換体が作製される。

【0023】

宿主として用いることのできる細胞としては、特に制限はなく、動物、植物、昆虫、原核微生物、真核微生物の細胞などが挙げられる。これらの細胞は個体を形成していてもよく、動物個体、植物個体、昆虫個体を宿主としてもよい。動物細胞では、付着性細胞、浮遊性細胞の何れも使用でき、糖鎖欠損型HGFを細胞内に生産蓄積する動物細胞でもよく、あるいは糖鎖欠損型HGFを細胞外に分泌生産する動物細胞でもよい。例えば、CHO細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞)、COS細胞、BHK細胞、マウスC127細胞、HeLa細胞などが挙げられる。植物細胞ではイネ、タバコ、シロイヌナズナなどを挙げることができ、昆虫細胞ではSf9やSf21などの細胞を挙げることができる。昆虫個体では例えばカイコを挙げることができる。原核微生物では大腸菌、枯草菌などが挙げられ、真核微生物ではSaccharomyces cerevisiae、Schiz

z osaccharomyces pombe、*Candida boidinii*、*Pichia pastoris*などの酵母あるいは*Aspergillus*属、*Trichoderma*属、*Mucor*属などの糸状菌を挙げることができる。好ましくは、酵母、昆虫細胞および昆虫個体である。これらのうち、原核生物の細胞では、糖鎖付加能がないため、野生型の糖鎖を有するHGF遺伝子を導入してもよい。

【0024】

得られた形質転換体は、目的とする糖鎖欠損型HGFを産生させるためにその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清および薬剤などが含有される。培地の例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地（日水製薬）、M9培地[J. Exp. Mol. Genet.、Cold Spring Laboratory、New York、1972年、p. 431]などを挙げられ、宿主が酵母の場合はYEPD培地（Genetic Engineering、第1巻、Plenum Press、New York、1979年、p. 117）などを挙げられる。宿主が動物細胞の場合、20%以下のウシ胎児血清を含有する改変イーグル培地（MEM培地）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM培地）、RPMI 1640培地（日水製薬）などを挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常20℃～45℃、pHは5～8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞などの場合は、ガラスビーズ、コラーゲンビーズ、あるいはアセチルセルロースフォローファイバーなどの担体が用いられる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば実施でき、これらに限定されるものではない。

【0025】

このようにして形質転換体の培養上清中または形質転換体中に生成した糖鎖欠損型HGFは、公知の塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外濾過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィなどを組み合わせて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、ヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィ、およびフェニルセファロース逆相クロマトグラフィの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、および抗HGF抗体セファロースアフィニティクロマトグラフィの組み合わせなどが好ましく、有効な精製法である。

【0026】

また、本発明の糖鎖欠損型HGFは、従来の既知の方法により糖鎖が付加したHGFを得た後、糖鎖を除去する酵素で該HGFを処理することでも得られる。糖鎖を除去する酵素としては、N-結合型糖鎖の除去の目的ではグリコペプチダーゼF、グリコペプチダーゼAなどを使用することができる。O-結合型糖鎖の除去は、シアリダーゼ、フコシダーゼ、O-グリカナラーゼなどの組み合わせによって達成される。酵素処理して得られた糖鎖除去HGFは、本発明の糖鎖欠損型HGFとして上述の精製法によって精製することができる。

【0027】

さらに、本発明の糖鎖欠損型HGFは、無細胞蛋白質合成システムを利用して得ることもできる。無細胞蛋白質合成システムとは、大腸菌、ウサギ網状赤血球細胞、小麦胚芽などから調製した細胞抽出液を用いるか、あるいは細胞抽出液中に含まれる蛋白質合成因子群を利用して、目的蛋白質をコードするDNAあるいはmRNAを鋳型として、生細胞を用いずに蛋白質合成を行う方法をいう。細胞抽出液にはリボソーム、tRNA、翻訳因子などの蛋白質合成に必要な分子群が含まれているため、これにATPやGTPなどのエネルギー源および基質となるアミノ酸を添加すると、蛋白質が合成される。細胞抽出液の代わりに、細胞抽出液中に含まれる蛋白質合成因子群を混合して用いてもよい。無細胞蛋白質合成システムでは、小胞体やゴルジ体が含まれないため、糖鎖付加部位を有する糖鎖を有するHGFをコードするDNAあるいはmRNAを鋳型として、糖鎖の欠損した糖鎖欠

損型HGFを生産することができる。また、糖鎖付加部位に変異を導入したDNAあるいはmRNAを用いることもできる。無細胞蛋白質合成反応液中に合成された糖鎖欠損型HGFは、上述の精製法によって精製することができる。

【0028】

上記のようにして得られる本発明の糖鎖欠損型HGFは、細胞増殖活性、細胞遊走活性、形態形成活性などにおいて糖鎖を有するHGFと同等の活性を有し、温度安定性も同等である。一方、本発明の糖鎖欠損型HGFは糖鎖を有するHGFよりも血中安定性が向上している。

【0029】

本発明に係わる糖鎖欠損型HGFは、ヒトおよび哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、モルモットなど）に適用できる。

本発明の糖鎖欠損型HGFを有効成分とする医薬は、野生型の糖鎖が付加されたHGFと同様の用途、例えば肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤などとして用いることができる。また、本発明の糖鎖欠損型HGFをコードするDNAを含む医薬は、上記疾患のための遺伝子治療薬として用いることができる。

【0030】

本発明の糖鎖欠損型HGFは蛋白質医薬品として有効であり、一般的な医薬製剤の形態で用いられる。本発明の糖鎖欠損型HGFを有効成分として含有する医薬製剤は、種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など）をとりうるが、一般的には有効成分である糖鎖欠損型HGFと結合性物質のみ、またはそれと慣用の担体と共に注射剤、吸入剤、坐剤または経口剤とされ、注射剤が好適である。当該注射剤は常法により調製することができる。例えば、糖鎖欠損型HGFおよび結合性物質を適切な溶剤（例えば、滅菌された水、緩衝液、生理食塩水など）に溶解した後、フィルターなどで濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中の糖鎖欠損型HGF含量としては、通常0.0002～3（W/V%）程度、好ましくは0.001～2（W/V%）程度に調製される。また、経口薬としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟または硬カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤などの剤形に製剤化され、これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。坐剤も慣用の基剤（例えば、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチン、マクロゴール、ウィテップゾルなど）を用いた製剤上の常法によって調製することができる。また、吸入剤も製剤上の常套手段に準じて調製することができる。製剤中の糖鎖欠損型HGF含量は、剤形、適用疾患などに応じて適宜調製することができる。

【0031】

本発明の糖鎖欠損型HGFの医薬製剤の製剤化に際して、安定化剤が添加されることが好ましい。安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、アラニン、グリシン、マンニトール、グルコース、デキストラン、ソルビトール、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の医薬製剤は製剤化に必要な他の添加物、例えば、溶剤（例えば、生理食塩液、滅菌精製水、注射用水など）、賦形剤（例えば、果糖、D-ソルビトール、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース、デキストリンなど）、結合剤（例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムなど）、溶解補助剤（例えば、ラウロマクロゴール、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、アラビアゴム、安息香酸ナトリウムなど）、酸化防止剤（例えば、L-アスコルビン酸、トコフェロール、エデト酸ナトリウムなど）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖、D-マンニトール、グルセリンなど）、緩衝剤（例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、乳酸、リン酸水素ナトリウムなど）、増粘剤（アラビアゴム、カルメロース

、ポピドン、メチルセルロースなど）、保存剤（例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウムなど）、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、クエン酸、酢酸など）などを含んでいてもよい。

液状製剤とした場合は凍結保存、または凍結乾燥などにより水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

また、経口剤とする場合には、顆粒、錠剤などは、腸溶性コーティング剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロースなど）などで剤皮を施されるのが好ましく、カプセル剤では、腸溶性カプセル剤とされるのが好ましい。

【0032】

本発明の医薬製剤は、その製剤形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与することができる。その投与量は、患者の疾患、症状、年齢、体重などにより適宜調整されるが、例えば、成人に対し、通常糖鎖欠損型HGFとして0.01mg～500mg、好ましくは0.05mg～100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

【0033】

本発明の糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列を有するDNAは、上記ベクターに組み込まれ、遺伝子治療薬としても用いることができる。

本発明の遺伝子治療薬は、上記の糖鎖欠損型HGF遺伝子と遺伝子運搬体との複合体として作製されることが好ましい。遺伝子運搬体としては、ウイルスベクター、カチオン性遺伝子運搬体などが好ましい。ウイルスベクターでは、例えば、マウス白血病ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、HIVベクター、ヘルペスシンプレックスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられる。カチオン性遺伝子運搬体では、例えば、ポリリジン、ポリジアミノ酪酸などのポリアミノ酸、リポソームやエチレンジアミンなどのカチオン性合成高分子などの遺伝子と親和性のある物質が挙げられる。

【0034】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

なお、実施例で使用する各略号の意味は、次のとおりである。

HGF：肝細胞増殖因子

dHGF：5アミノ酸欠失型肝細胞増殖因子

LB培地：Luria-Bertani培地

DMEM培地：ダルベッコ改変イーグル培地

Amp：アンピシリン

FCS：牛胎児血清

NaCl：塩化ナトリウム

BSA：ウシ血清アルブミン

PBS：リン酸緩衝食塩水

Tween 80：ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート

【実施例1】

【0035】

配列表の配列番号3に示される5アミノ酸欠失型HGF（dHGF；野生型dHGFということもある。）をコードする塩基配列をpCAGGSベクターに組み込んだ。得られたベクター（以下、野生型ベクターという。）をpCAGGS-dHGFと称する。

dHGF蛋白質に存在する5箇所の糖鎖付加部位（配列表の配列番号2の289位、397位、471位、561位、648位）に変異を導入するため、表1の5種類の変異プライマー（5'ーリン酸化）を合成し、pCAGGS-dHGFベクターをテンプレートとして変異導入を実施した。この変異により、配列番号2で示されるアミノ酸配列のうち

、Asn 289、Asn 397、Asn 561、Asn 648はGlnに、Thr 471はGlyに置換される。

【表1】

プライマー	配列表
5' -tgc gct gac aat act atg caa gac act gat gtt cct ttg-3'	配列番号 4
5' -ggc aaa aat tat atg ggc cag tta tcc caa aca aga tct gg-3'	配列番号 5
5' -tgc aaa cag gtt ctg caa gtt tcc cag ctg gta tat gg-3'	配列番号 6
5' -ggg aag gtg act ctg caa gag tct gaa ata tgt gct gg-3'	配列番号 7
5' -ggg gat acc aca cct gga ata gtc aat tta gac cat cc-3'	配列番号 8

【0036】

変異導入にはSTRATAGENE社のQuickChange Multi Kitを利用した。変異の導入されたベクター（以下、変異ベクターという。）はE. coli XL10 Goldのコンピテント細胞に形質転換し、LB/Ampプレート上でAmp耐性コロニーをピックアップした。得られた各クローンからプラスミドを抽出し、糖鎖欠損型HGFのコード部分について塩基配列を解析することによって、目的のクローンをスクリーニングした。5箇所目的の変異が導入され、また他の変異がないことが確認できたベクターを選択し、以後の実験に用いた。得られた変異ベクターはpCAGGS-dHGF-NGと称する。また、上記1、2、3の3種の変異プライマーを用いて同様の操作を行い、 α 鎖の3箇所の糖鎖を欠損するように設計した変異ベクターpCAGGS-dHGF- α NGを作製した。さらに、上記3、4の変異プライマーを用いて同様の操作を行い、 β 鎖の2箇所の糖鎖を欠損するように設計した変異ベクターpCAGGS-dHGF- β NGを作製した。

【0037】

次に、野生型ベクターpCAGGS-dHGFおよび変異ベクターpCAGGS-dHGF-NG、pCAGGS-dHGF- α NG、pCAGGS-dHGF- β NGをそれぞれCOS-7細胞にトランスフェクトした。COS-7細胞はDMEM培地に牛胎児血清（FCS）を10%添加して培養した。細胞はトランスフェクションの直前に無血清DMEM培地に交換した。トランスフェクションはリポフェクタミン2000（Invitrogen）を用いてリポフェクション法によって行った。トランスフェクションの6時間後、1%FCSを含むDMEMに培地交換し、その際にヘパリンを1 μ g/mLとなるように添加した。これを3日間培養し、野生型dHGFおよび糖鎖欠損型dHGFを培地中に蓄積させた。3日後に培地を回収して混合し、0.22 μ mフィルターで濾過した後、精製に供するまで-80℃で保存した。培地中に分泌された野生型dHGFおよび糖鎖欠損型dHGFの濃度はELISAによって分析した。

【0038】

上記の培地を解凍し、再度0.22 μ mフィルターで濾過した後、50mM Tris-HCl（pH7.5）、0.01%Tween80、0.3M NaClで平衡化したHiTrap Heparin（Bed volume: 5mL）（Amersham Biosciences）に0.6mL/分の流速で添加した。カラムを50mM Tris-HCl（pH7.5）、0.01%Tween80、0.3M NaClで洗浄後、NaCl濃度を2Mまで上昇させることによって野生型dHGFおよび糖鎖欠損型dHGFを溶出させた。溶出は1mL/分の流速で行い、2.5mL/tubeで分画した。野生型dHGFおよび糖鎖欠損型dHGFの存在する画分を回収し、限外濾過によって50mM Tris-HCl（pH7.5）、0.01%Tween80、0.3M NaClにbuffer交換した。これを同bufferで平衡化したMini Sカラム（Bed volume: 0.8mL）（Amersham Biosciences）に0.4mL/分の流速で添加した。カラムを50mM Tris-HCl（pH7.5）

、0.01% Tween 80、0.3M NaClで洗浄後、NaCl濃度を1Mまで上昇させることによって野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を溶出させた。溶出は0.4 mL/分の流速で行い、0.4 mL/tube で分画した。野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF の存在する画分を回収し、精製状態を SDS-PAGE によって確認した。

【0039】

野生型ベクターの導入によって得られた dHGF を COS-dHGF-WT、変異ベクターの導入によって得られた糖鎖欠損型 dHGF をそれぞれ COS-dHGF-NG、COS-dHGF- α NG、COS-dHGF- β NG と称する。

また、特開平10-191991に記載の方法に従って CHO 細胞によっても dHGF 蛋白質を調製した (CHO-dHGF-WT と称する)。

【0040】

これらの dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を SDS-PAGE によって比較した結果を図1に示す。糖鎖欠損型 dHGF の COS-dHGF-NG では、 α 鎖および β 鎖ともに糖鎖を欠損する分子量に対応する位置にバンドがシフトしていることが確認された。糖鎖付加型 (野生型) dHGF である COS-dHGF-WT と CHO-dHGF-WT を比較すると、COS-dHGF-WT は CHO-dHGF-WT より糖鎖付加の程度が少ないが、これは宿主として用いた COS 細胞と CHO 細胞の糖鎖付加能力の差あるいは精製方法の差によるものと考えられた。 α 鎖の糖鎖のみを欠損する COS-dHGF- α NG では、 α 鎖のバンドが糖鎖を欠損する分子量に対応する位置にシフトしていることが確認された。 β 鎖の糖鎖のみを欠損する COS-dHGF- β NG では、 β 鎖のバンドが糖鎖を欠損する分子量に対応する位置にシフトしていることが確認された。

【実施例2】

【0041】

実施例1で得られた野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を用いて、ラット肝実質細胞に対する増殖活性を測定した。

SDラット (8週齢、雄) から、コラゲナーゼ灌流法によって肝実質細胞を分離した。得られた肝実質細胞を 5% FCS を含むウィリアムズ E (WE) 培地に懸濁し、3万個/cm² の細胞密度で培養ディッシュに播いた。4時間後に培地を除去して新しい WE 培地 (5% FCS を含む) 480 μ L に置換し、培養を継続した。さらに20時間後に野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を含むサンプル溶液を 20 μ L 添加し、培養を継続した。野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を添加してから20時間の後、[³H] チミジン (25 Ci/mmol) を 2.5 μ Ci/mL となるように添加し、さらに培養を6時間継続した。その後、細胞を PBS で2回洗浄し、10% トリクロロ酢酸を添加して4℃で20分間静置した。さらに、新しい10% トリクロロ酢酸に置換して10分間静置し、次に H₂O 1 mL で洗浄した。これに 0.5N-NaOH を加えて37℃で30分間インキュベートし、細胞を溶解させた。細胞溶解液に 1N-HCl を加えて中和した。これをセルハーベスターにかけ、細胞溶解物をガラスフィルターに捕集した。フィルターを乾燥させた後、フィルター上に固形シンチレーター (Meltilex) をのせてホットプレート上で加温し、シンチレーターをフィルター中に溶け込ませた後、 β -カウンターによって放射活性を測定した (図2)。放射活性の値は、細胞に取り込まれた [³H] チミジンの量を表しており、これは細胞増殖に伴う DNA 合成の量を反映している。すなわち、放射活性の値は、細胞増殖活性を反映している。

糖鎖欠損型 dHGF (COS-dHGF-NG) は、野生型 dHGF (COS-dHGF-WT および CHO-dHGF-WT) と同等の肝細胞増殖活性を示した。 α 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- α NG および β 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- β NG も同等の活性を示した。

【実施例3】

【0042】

MDCK-3B細胞を DMEM (10% FCS を含む) に懸濁して 24 well プレー

トに 1×10^4 cells/well ($480 \mu\text{L}$ /well) で播き、ここに野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を含む被検サンプル $20 \mu\text{L}$ を添加した。37℃で20時間培養した後、scatter の有無を顕微鏡で観察した (図3)。

糖鎖欠損型 dHGF (COS-dHGF-NG) は、野生型 dHGF (COS-dHGF-WT および CHO-dHGF-WT) と同等の細胞遊走活性を示した。 α 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- α NG および β 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- β NG も同等の活性を示した。

【実施例4】

【0043】

DMEM (10% FCS を含む) に溶解したコラーゲン溶液 (Cellmatrix I-A、新田ゼラチン) に MDCK-3B 細胞を懸濁して 5000 cells/mL の溶液とし、24well プレートに $500 \mu\text{L}$ ずつ分注した (2500 cells/well)。37℃で10分間インキュベートしてコラーゲンをゲル化した後、DMEM (10% FCS を含む) を $480 \mu\text{L}$ 上層し、ここに野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を含む被検サンプル $20 \mu\text{L}$ を添加した。37℃で6日間培養した後、チューブ形成の状態を顕微鏡で観察した (図4)。

糖鎖欠損型 dHGF (COS-dHGF-NG) は、野生型 dHGF (COS-dHGF-WT および CHO-dHGF-WT) と同等の形態形成活性を示した。 α 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- α NG および β 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- β NG も同等の活性を示した。

【実施例5】

【0044】

野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF サンプルを 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01% Tween 80、0.3M NaCl で希釈して $50 \mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し、密封した容器に入れて37℃で7日間インキュベートした。経時的に一部をサンプリングして、-80℃に保存した。サンプリングした溶液中の野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF の残存活性を、実施例2と同様にしてラット肝実質細胞における DNA 合成を調べることによって評価した。活性測定にあたっては、サンプリングした溶液を PBS、0.5% BSA で 125 ng/mL に希釈した後、その $20 \mu\text{L}$ を肝細胞の培養液 $480 \mu\text{L}$ に添加して final 5 ng/mL とした。

糖鎖欠損型 dHGF (COS-dHGF-NG) は、野生型 dHGF (COS-dHGF-WT および CHO-dHGF-WT) と同等の温度安定性を示した (図5)。 α 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- α NG および β 鎖の糖鎖を欠損する COS-dHGF- β NG も同等の安定性を示した。

【実施例6】

【0045】

$80 \mu\text{L}$ の 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01% Tween 80、0.3M NaCl に Na^{125}I を $50 \mu\text{Ci}$ 添加し、これに IODO-BEADS (PIERCE) を1粒添加して、室温で5分間インキュベートした。ここに $5 \mu\text{g}$ の野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF を含む $20 \mu\text{L}$ の溶液 (50mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01% Tween 80、0.3M NaCl) を添加し、室温で5分間インキュベートすることによってヨード化反応を行った。チューブから反応液を抜き出すことによってヨード化反応を停止させ、抜き出した反応液を Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) カラムによるゲル濾過に供することによって未反応の Na^{125}I を除去し、 ^{125}I -dHGF を精製した。

$500,000$ cpm の ^{125}I -dHGF を、0.1% BSA を含む PBS で希釈して $100 \mu\text{L}$ の溶液とした。これを ICR マウス (8週齢、雄) に尾静脈から投与した。投与後、1分、5分、15分、30分、60分、120分に血液を採取した。採取した血液から血漿を分離し、ガンマカウンターにて放射活性を測定し野生型 dHGF および糖鎖欠損型 dHGF の血中安定性を評価した (図6)。

糖鎖欠損型 d H G F (C O S - d H G F - N G) は、 C H O - d H G F - W T に比べて、血中の安定性が向上していた。 C O S - d H G F - W T は C O S - d H G F - N G と C H O - d H G F - W T の中間の安定性を示した。これは、実施例 1 に示したように、 C O S - d H G F - W T が糖鎖を部分的に欠損しているためと考えられた。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 4 6 】

本発明の糖鎖欠損型 H G F は、糖鎖が付加した H G F の代替 H G F として有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 7 】

【図 1】各 H G F の S D S - P A G E による分析結果を示す図である。各 H G F を還元処理して泳動した後、ゲルを銀染色した。

【図 2】 H G F の肝実質細胞増殖活性について、ラット肝実質細胞の D N A 合成量を指標として示した図である。

【図 3】 H G F の細胞遊走活性について、 M D C K 細胞の分散の程度によって比較した結果を示す図である。

【図 4】 H G F の形態形成活性について、 M D C K 細胞の管腔形成の程度によって比較した結果を示す図である。

【図 5】 H G F の温度安定性を示す図である。 3 7 ℃ において各 H G F を表示された日数の間インキュベートした。残存活性をラット肝実質細胞の D N A 合成量を指標として測定し、相対値として表した。

【図 6】 H G F の血中安定性を示す図である。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Toshikazu Nakamura

<120> Modified hepatocellular growth factor

<130> N13J260

<160> 8

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

<213> Homo sapience

<220> hepatocellular growth factor

<223>

<400> 1

```

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
      5              10              15
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
      20              25              30
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
      35              40              45
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
      50              55              60
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65      70              75              80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
      85              90              95
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
      100             105             110
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
      115             120             125
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
      130             135             140
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145             150             155             160
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
      165             170             175
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
      180             185             190
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
      195             200             205
Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
      210             215             220
His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
225             230             235             240
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
      245             250             255
Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
      260             265             270
Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
      275             280             285
Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu

```

290 295 300
 Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 305 310 315 320
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 355 360 365
 Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp
 370 375 380
 Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 385 390 395 400
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp
 405 410 415
 Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His
 435 440 445
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460
 Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475 480
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
 485 490 495
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
 500 505 510
 Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525
 Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 545 550 555 560
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590
 Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 625 630 635 640
 Lys Cys Ser Gln His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
 645 650 655
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
 660 665 670
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
 675 680 685
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly

690
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 705 710 715 720
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 725

<210> 2

<211> 723

<212> PRT

<213> Homo sapience

<220> hepatocellular growth factor of five amino acid deletion

<223>

<400> 2

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 5 10 15
 Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30
 Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45
 Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60
 Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95
 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110
 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160
 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
 165 170 175
 Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
 180 185 190
 Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
 195 200 205
 Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
 210 215 220
 Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
 225 230 235 240
 Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
 245 250 255
 Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
 260 265 270
 Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
 275 280 285
 Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln

290 295 300
 Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
 305 310 315 320
 Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
 325 330 335
 Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 340 345 350
 Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
 355 360 365
 Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
 370 375 380
 Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
 385 390 395 400
 Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp5
 405 410 415
 Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
 420 425 430
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445
 Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
 450 455 460
 Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
 465 470 475 480
 Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
 485 490 495
 Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
 500 505 510
 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
 515 520 525
 Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
 530 535 540
 Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
 545 550 555 560
 Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
 565 570 575
 Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
 580 585 590
 Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
 595 600 605
 Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu
 610 615 620
 Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
 625 630 635 640
 His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
 645 650 655
 Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu
 660 665 670
 Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro5
 675 680 685
 Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val

690	695	700
Ala Tyr Tyr Ala Lys	Trp Ile His Lys Ile Ile	Leu Thr Tyr Lys Val
705	710	715
Pro Gln Ser		720
		723

<210> 3

<211> 2172

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220> hepatocellular growth factor of five amino acid deletion

<223>

<400> 3

```

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc      60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat      120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa      180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt      240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc      300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa      360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta      420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac      480
agctatcggg gtaaagacct acaggaanaac tactgtcgaa atcctcgagg ggaagaaggg      540
ggaccctggg gtttcacaag caatccagag gtacgctacg aagtctgtga cattcctcag      600
tgttcagaag ttgaatgcat gacctgcaat ggggagagtt atcgaggtct catggatcat      660
acagaatcag gcaagatttg tcagcgctgg gatcatcaga caccacaccg gcacaaattc      720
ttgcctgaaa gatatccga caagggttt gatgataatt attgccgcaa tcccgatggc      780
cagccgaggg catggtgcta tactcttgac cctcacaccc gctgggagta ctgtgcaatt      840
aaaacatgcg ctgacaatac tatgaatgac actgatgttc ctttggaac aactgaatgc      900
atccaaggtc aaggagaagg ctacaggggc actgtcaata ccatttggaa tggaattcca      960
tgtcagcgtt gggatttctca gtatcctcac gagcatgaca tgactcctga aaatttcaag      1020
tgcaaggacc tacgagaaaa ttactgccga aatccagatg ggtctgaatc accctggtgt      1080
tttaccactg atccaaacat ccgagttggc tactgtctcc aaattccaaa ctgtgatatg      1140
tcacatggac aagattgtta tcgtgggaat ggcaaaaatt atatgggcaa cttatcccaa      1200
acaagatctg gactaacatg ttcaatgtgg gacaagaaca tggaagactt acatcgtcat      1260
atcttctggg aaccagatgc aagtaagctg aatgagaatt actgccgaaa tccagatgat      1320
gatgctcatg gaccctgggtg ctacacggga aatccactca ttcttggga ttattgccct      1380
atttctcgtt gtgaagggtga taccacacct acaatagtca atttagacca tcccgttaata      1440
tcttgtgcca aaacgaaaca attgcgagtt gtaaatggga ttccaacacg aacaaacata      1500
ggatggatgg ttagtttgag atacagaaat aaacatatct gcggaggatc attgataaag      1560
gagagtggg ttcttactgc acgacagtgt ttcccttctc gagacttgaa agattatgaa      1620
gcttggcttg gaattcatga tgtccacgga agaggagatg agaaatgcaa acaggttctc      1680
aatgtttccc agctgggtata tggccctgaa ggatcagatc tggttttaat gaagcttgcc      1740
aggcctgctg tcctggatga ttttgttagt acgattgatt tacctaatta tggatgcaca      1800
attcctgaaa agaccagttg cagtgtttat ggctggggct acactggatt gatcaactat      1860
gatggcctat tacgagtggc acatctctat ataatgggaa atgagaaatg cagccagcat      1920
catcgaggga aggtgactct gaatgagtct gaaatatgtg ctggggctga aaagattgga      1980
tcaggacat gtgaggggga ttatggtggc ccacttgttt gtgagcaaca taaaatgaga      2040
atggttcttg gtgtcattgt tcctggtcgt ggatgtgcca ttccaaatcg tcctggtatt      2100
tttgtccgag tagcatatta tgcaaaatgg atacacaaaa ttattttaac atataaggta      2160
ccacagtcat ag                                     2172

```

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 4

tgcgctgaca atactatgca agacactgat gttcctttg

39

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 5

ggcaaaaatt atatgggccca gttatcccaa acaagatctg g

41

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 6

tgcaaacagg ttctccaagt ttcccagctg gtatatgg

38

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 7

gggaaggtga ctctgcaaga gtctgaaata tgtgctgg

38

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223>

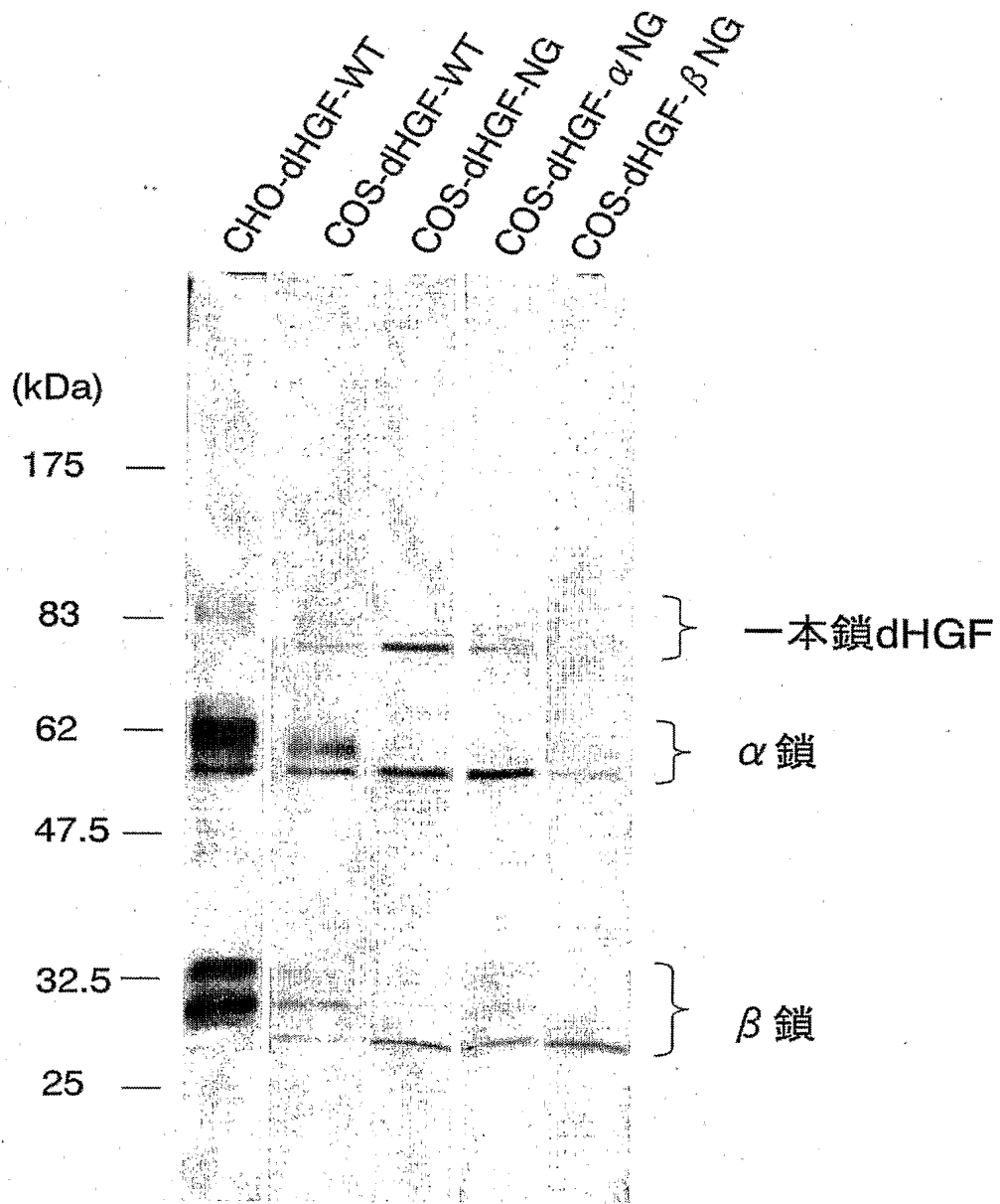
<400> 8

ggtgatacca cacctggaat agtcaattta gaccatcc

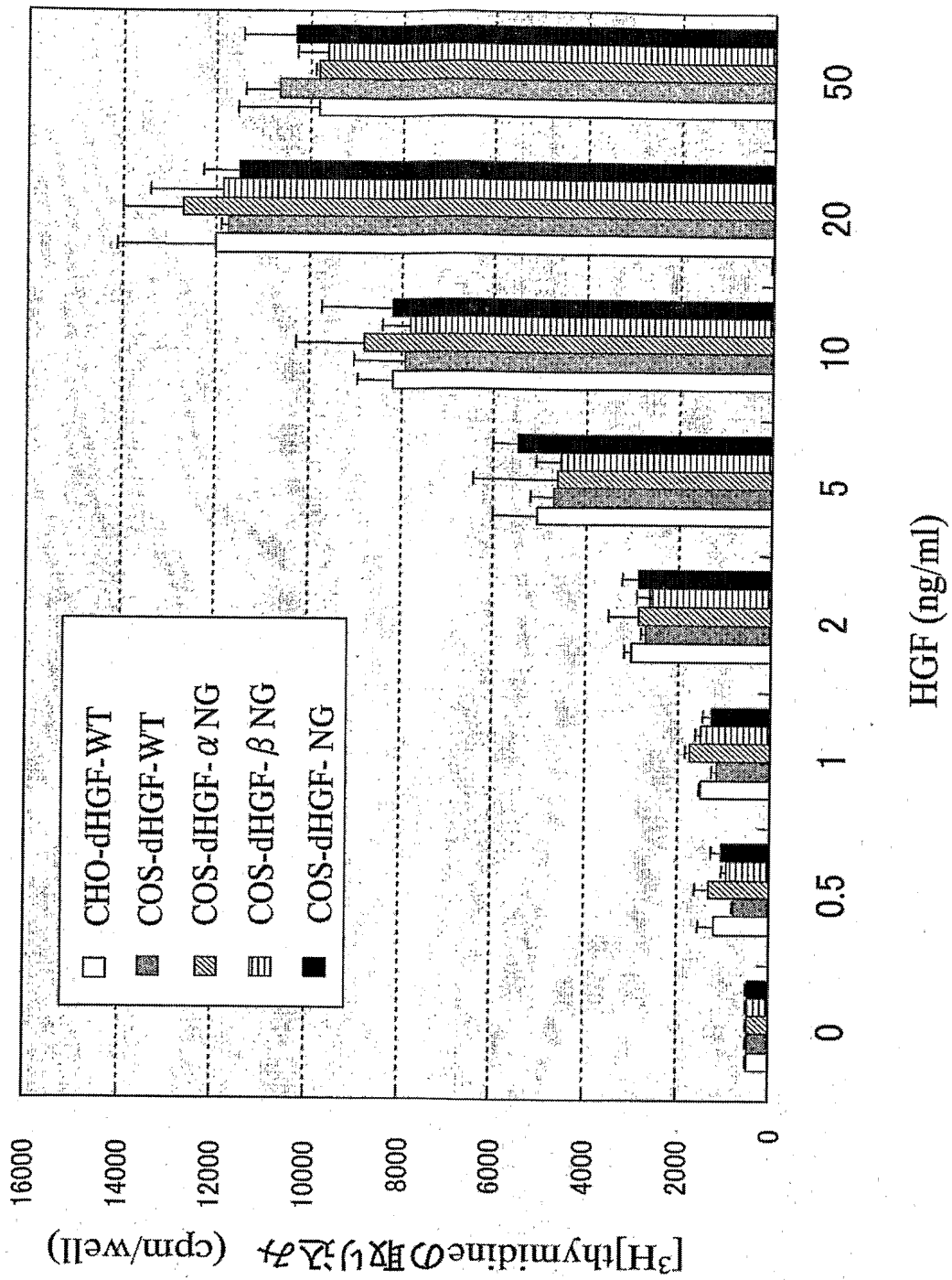
38

【書類名】 図面

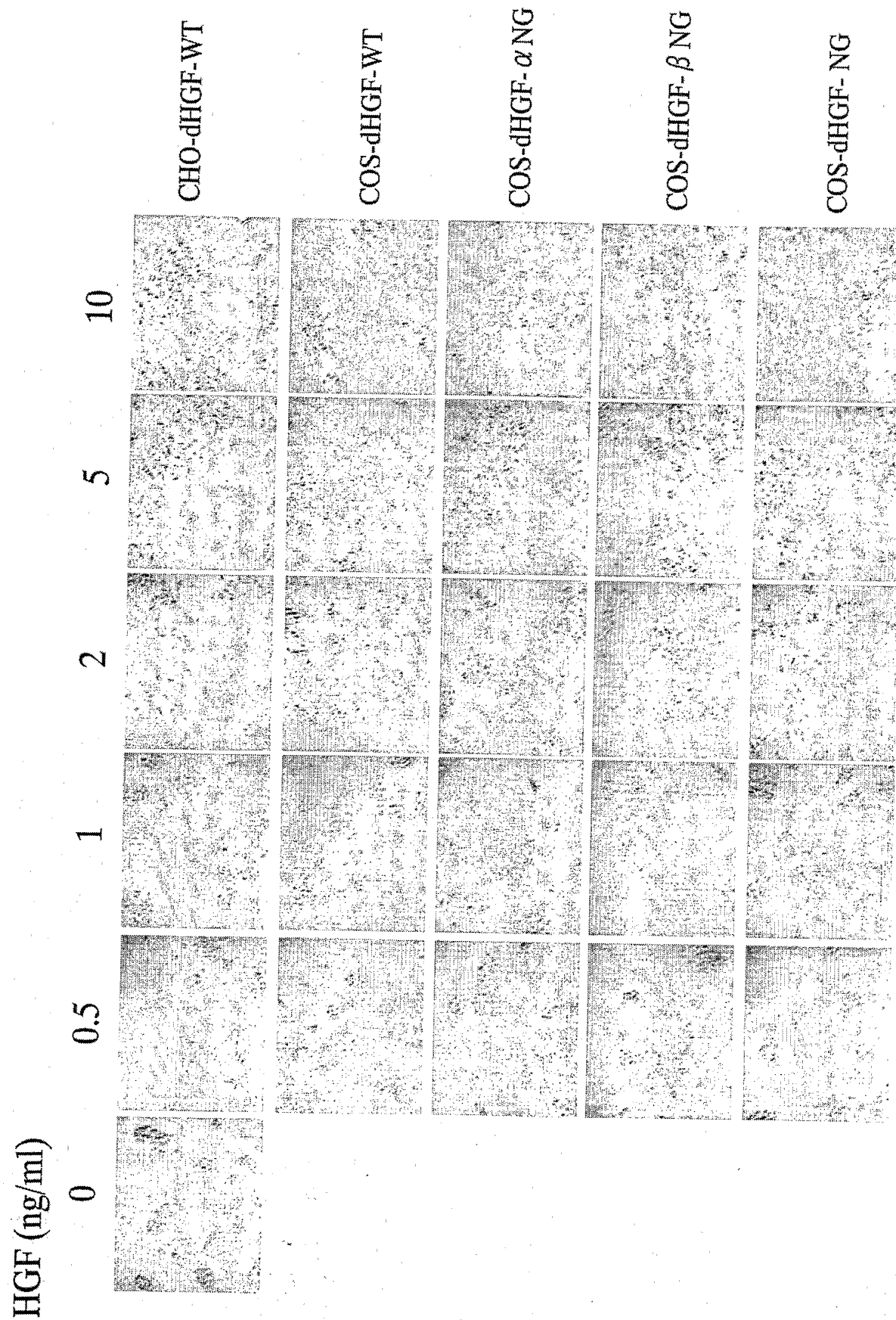
【図 1】



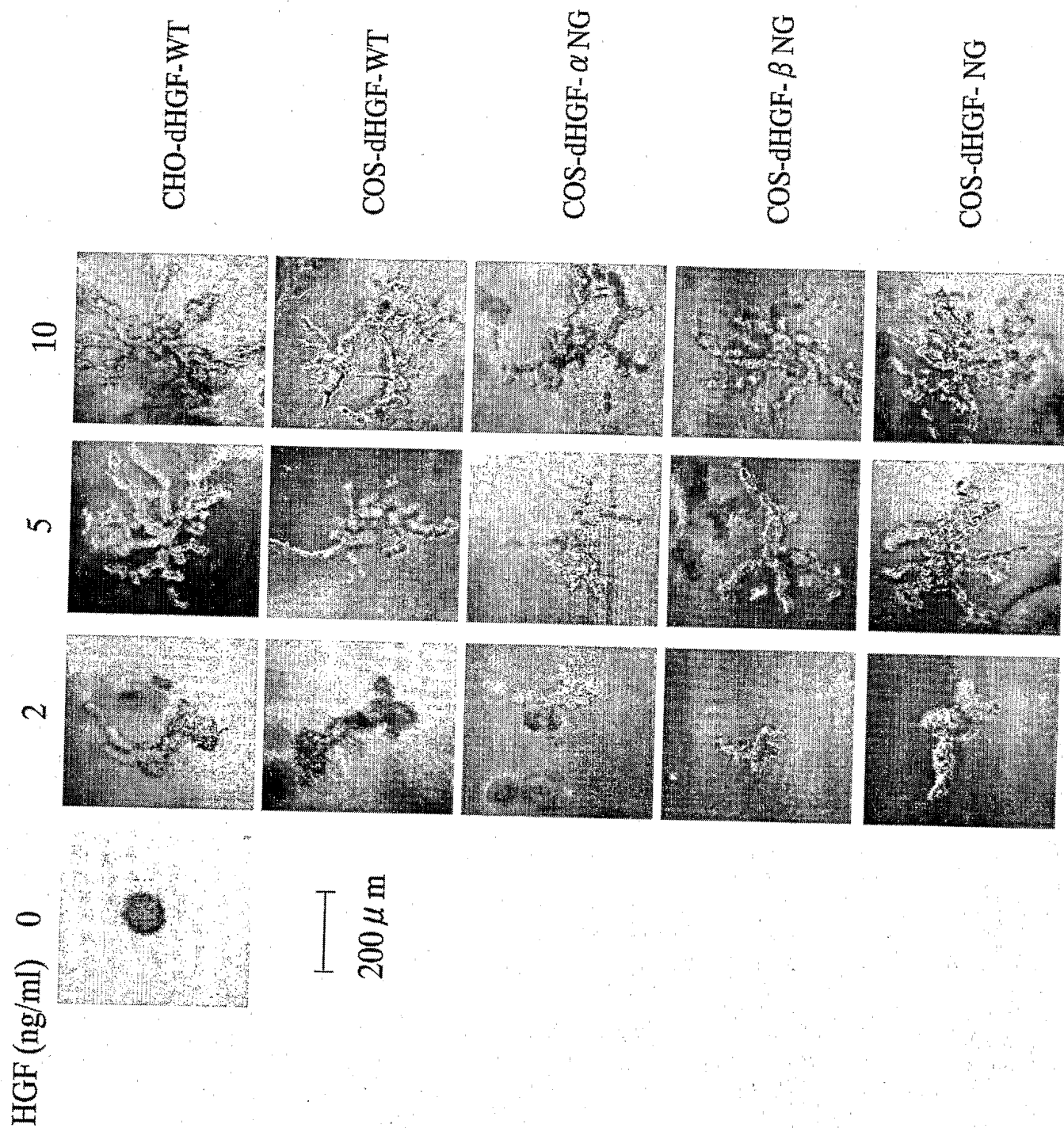
【図 2】



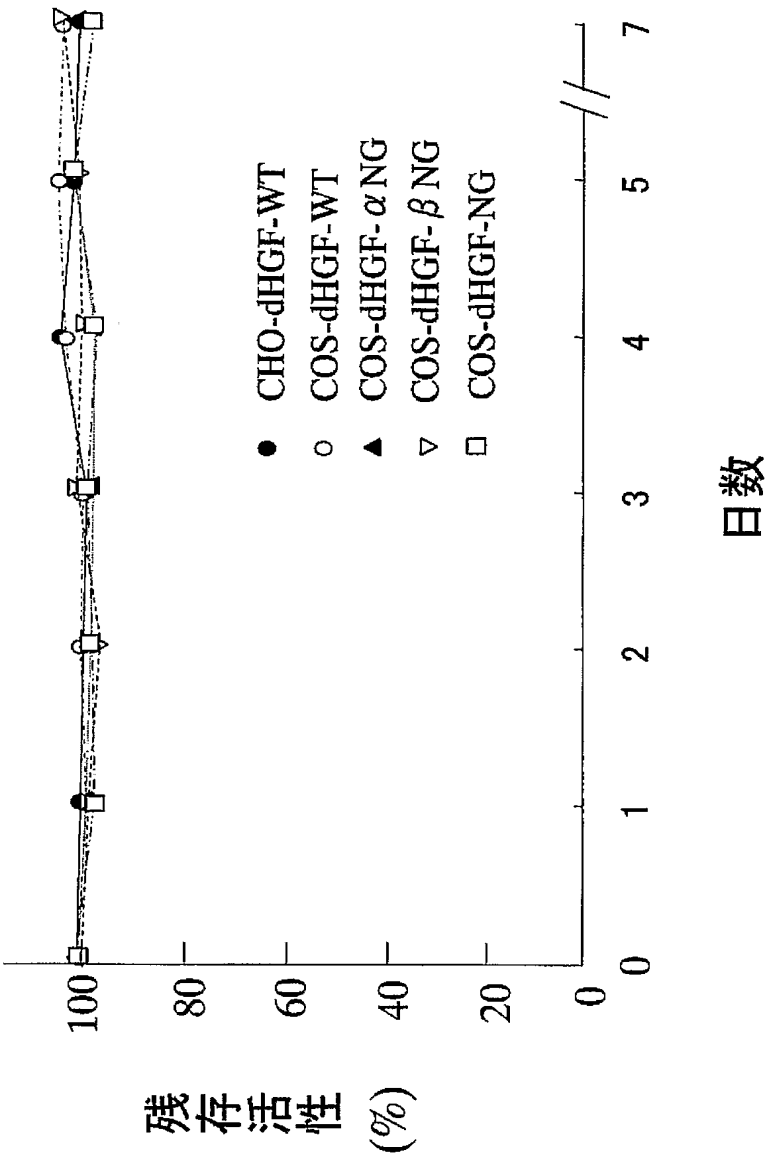
【図 3】



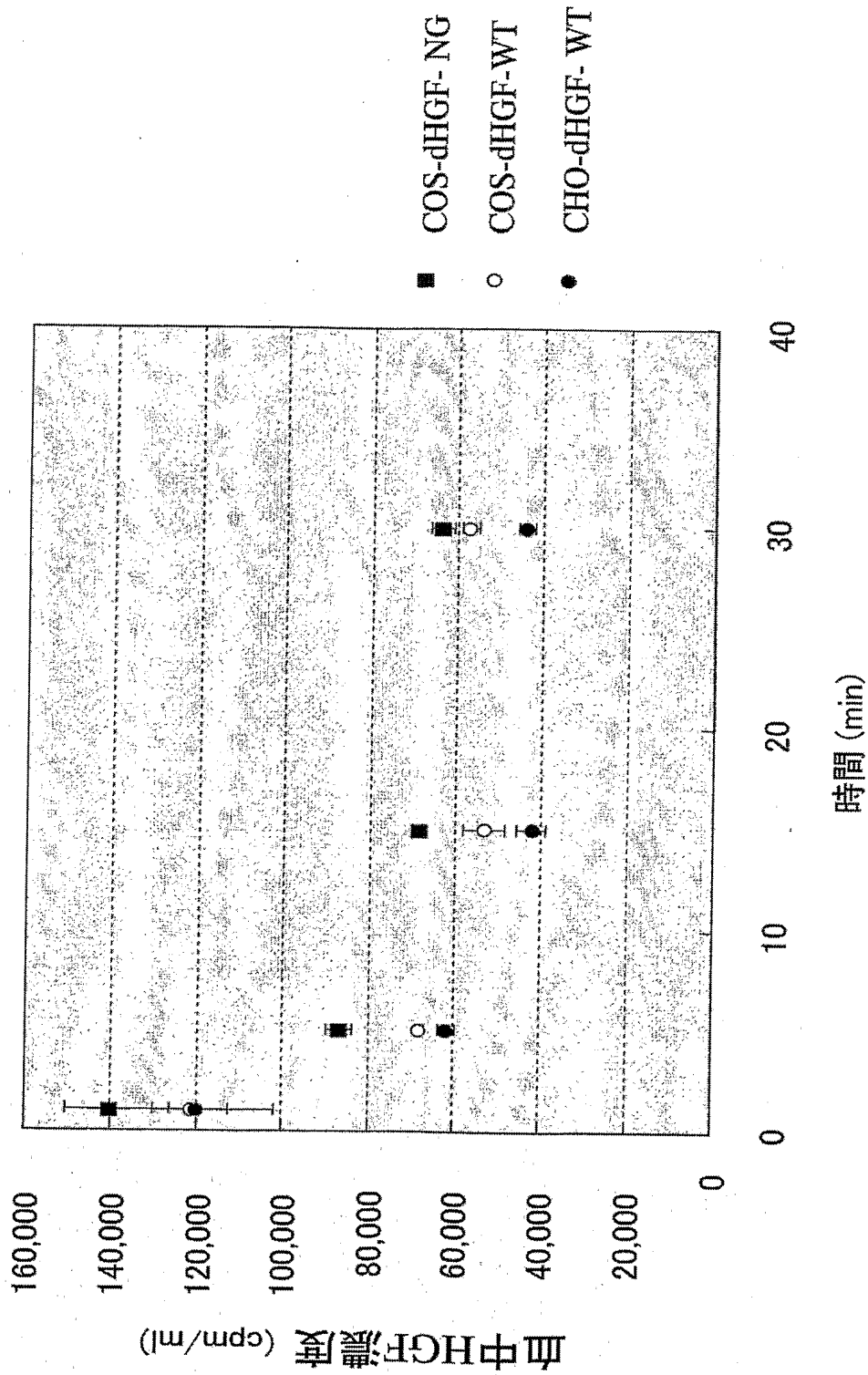
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 H G F の糖鎖を欠損させた改変体およびその製造方法を提供すること。

【解決手段】 肝細胞増殖因子の少なくとも 1 ヶ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異を導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 2 5 6 9 1

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 1 1 5 0 7 3]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

2 0 0 3 年 1 2 月 9 日
住所変更
京都府京都市左京区岡崎法勝寺町 1 番地の 4
中村 敏一